

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

**DE 19520210**

1/7/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI  
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.  
011044128 WPI Acc No: 1997-022052/199703

**Determn. of triglyceride(s) in protein fractions - by electrophoretic sepn., enzymatic hydrolysis and glycerol determn.**

Patent Assignee: MAERZ W (MAER-I); NAUCK M (NAUC-I); WIELAND H (WIEL-I);  
WINKLER K (WINK-I)  
Inventor: MAERZ W; NAUCK M; WIELAND H; WINKLER K  
Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

**Patent Family:**

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 19520210	A1	19961205	DE 1020210	A	19950601	199703 B

Priority Applications (No Type Date): DE 1020210 A 19950601

**Patent Details:**

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
DE 19520210	A1	11	C12Q-001/61	

**Abstract (Basic): DE 19520210 A**

Determn. of triglycerides in protein fractions comprises:

- (a) electrophoretic sepn. of the protein fractions in a suitable matrix,
- (b) enzymatic cleavage of the triglycerides and
- (c) determn. of the resulting glycerol.

USE - The method is used for in-vitro diagnosis of vascular disorders (claimed), e.g. coronary heart disease, peripheral arterial occlusion and microangiopathy.

ADVANTAGE - The method provides a simple routine assay for LDL triglycerides and opt. other fractions (e.g. VLDL and HDL) and opt. also free triglycerides.

Dwg.0/3

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12Q-001/61

International Patent Class (Additional): C12Q-001/32; C12Q-001/44;  
C12Q-001/533; C12Q-001/60



⑮ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Off nlegungss hrift  
⑩ DE 195 20 210 A 1

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 12 Q 1/61**  
C 12 Q 1/44  
C 12 Q 1/32  
C 12 Q 1/533  
C 12 Q 1/60

⑲ Aktenzeichen: 195 20 210.4  
⑳ Anmeldetag: 1. 6. 95  
㉑ Offenlegungstag: 5. 12. 96

DE 195 20 210 A 1

⑦ Anmelder:

Wieland, Heinrich, Prof. Dr.med., 79271 St Peter, DE;  
März, Winfried, Dr.med., 63073 Offenbach, DE;  
Nauck, Matthias, Dr.med., 79104 Freiburg, DE;  
Winkler, Karl, Dr.med., 79098 Freiburg, DE

⑦ Vertreter:

Tiedtke, Bühling, Kinne & Partner, 80336 München

⑦ Erfinder:

gleich Anmelder

⑥ Entgegenhaltungen:

US 41 47 606  
EP 03 44 580 A1

BRUCKNER, A., MORETH, M.: J. Clin. Chem. Clin  
Biochem. 21 (1983) 97-106;

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤ Verfahren zur Bestimmung von Triglyceriden in Proteinfractionen, Enzymlösung zur Durchführung des Verfahrens sowie Verwendung des Verfahrens

⑤ Ein Verfahren zur Bestimmung von Triglyceriden in Proteinfractionen mit den folgenden Schritten wird beschrieben:

- a) elektrophoretische Auftrennung der Proteinfractionen in einer geeigneten Matrix,
  - b) enzymatische Spaltung der Triglyceride und
  - c) Bestimmung des durch Schritt b) entstandenen Glycerins.
- Zur Durchführung dieses Verfahrens eignet sich besonders gut eine Enzymlösung, die die Enzyme Esterase, Glycerokinase und Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, vorzugsweise zusätzlich die Enzyme Triosephosphat-Isomerase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und einen Elektronenkoppler, umfaßt.

DE 195 20 210 A 1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Triglyceriden in Proteinfractionen.

Die koronare Herzkrankheit ist nach wie vor in den westlichen Industrienationen die Haupttodesursache.

5 Während die Bedeutung des Cholesterins als Risikofaktor für die koronare Herzkrankheit allgemein anerkannt ist, wird in diesem Zusammenhang auch die Beurteilung von proteinassoziierten Triglyceriden, die im Blutserum in den sogenannten Lipoproteinen vorliegen, in Betracht gezogen.

Die Aufteilung der Serumproteinfractionen erfolgt auf der Basis der unterschiedlichen Dichte in Lipoproteine mit sehr niedriger Dichte ("very low density lipoproteins", im folgenden VLDL abgekürzt), Lipoproteine mit  
10 niedriger Dichte ("low density lipoproteins", LDL) und Lipoproteine mit hoher Dichte ("high density lipoproteins", HDL).

Für die Diagnosestellung von Gefäßerkrankungen, wie der koronaren Herzkrankheit, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und mikroangiopathischen Veränderungen, ist der Triglyceridgehalt in den einzelnen Proteinfractionen sowie der relativen Gehaltsmengen der Proteinfractionen untereinander von Bedeutung.  
15 Insbesondere für die LDL-Fraktion wird angenommen, daß ein hoher Triglyceridgehalt mit der koronaren Herzkrankheit assoziiert ist.

Einfache Verfahren und Mittel zur Bestimmung des Triglyceridgehalts in einzelnen Proteinfractionen, insbesondere der LDL-Fraktion, fehlen bisher.

Die Präzipitationstechnik ist in erster Linie auf die Bestimmung des Triglyceridgehalts in Serumproteinen hoher Dichte (HDL) ausgelegt. Die selektive Präzipitierung von LDL-Triglyceriden ist zwar versucht worden;  
20 jedoch ist die reine Präzipitationstechnik nachteilig, da beträchtliche Mengen an VLDL mit der LDL-Proteinfraction kopräzipitieren, so daß eine Differenzierung des Triglyceridgehalts in den jeweiligen Serumproteinen nur schlecht möglich ist (s. R. Siekmeier et al. in Clin. Chim. Acta 177, S. 231—230: "Precipitation of low density lipoproteins with sulfonated polyanions" (1988), R. Siekmeier et al. in Clin. Chem. 36, S. 2109—2113: "Insufficient accuracy and specificity of polyanion precipitation methods for the quantitation of low density lipoproteins" (1990),  
25 und M. Nauck et al. in Klin. Lab. 40, S. 167—176: Measurement of LDL and VLDL cholesterol with precipitation techniques. A comparison with the ultracentrifugation method" (1994).

Daher wurden LDL-Triglyceride in der Praxis mittels sequenzieller Ultrazentrifugation ihrer Dichte entsprechend in der Ultrazentrifuge, wobei sich die Dauer bis zum Erhalt der LDL-Fraktion auf 48 Std. beläuft, oder  
30 durch ein verkürztes, kombiniertes Verfahren aus Ultrazentrifugation und Präzipitation bestimmt. Bei der letztgenannten, relativ selektiven Auftrennung wird zunächst die VLDL-Fraktion mit der Ultrazentrifuge abgetrennt (Dauer etwa 24 Std.), und die dann verbleibende LDL-Fraktion wird mehr oder weniger selektiv durch geeignete Agenzien gefällt (Manual of Laboratory Operation (1979); DHEW No (NIH) 75—628 National Heart and Lung Institute; Lipid Research Clinics Program, Bethesda MD, USA, S. 1—74). Daraufhin werden aus der  
35 Triglyceridkonzentration vor und nach der LDL-Präzipitation die Menge an LDL-Triglyceriden rechnerisch ermittelt.

Für diese kombinierten Ultrazentrifugations-/Präzipitierungs-Verfahren besteht jedoch der Nachteil, daß neben einem beträchtlichen zeitlichen auch ein bedeutender apparativer Aufwand erforderlich ist, der von einem Routinelabor in aller Regel nicht geleistet werden kann. Sieht man allerdings die LDL-Triglyceridkonzentration  
40 als besonders aussagekräftig für die Prävention der koronaren Herzkrankheit an, so ist gerade die routinemäßige Erfassung der LDL-Triglyceride erwünscht.

Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zugrunde, die Bestimmung von Triglyceriden in Proteinfractionen so zu verbessern, daß diese auch in der Routinediagnostik der Herzinfarktprävention angewendet werden kann.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Bestimmung von Triglyceriden in Proteinfractionen gelöst, das  
45 durch die folgenden Schritte gekennzeichnet ist:

- a) elektrophoretische Auftrennung der Proteinfractionen in einer geeigneten Matrix,
- b) enzymatische Spaltung der Triglyceride und
- c) Bestimmung des durch Schritt b) entstandenen Glycerins.

50 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Bereitstellung einer Enzymlösung nach Anspruch 15, die sich als ein Mittel zur Durchführung des oben genannten Verfahrens besonders gut eignet.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung des oben genannten Verfahrens zur In-Vitro-Diagnose von Gefäßerkrankungen. Hierunter fällt insbesondere die Diagnose der koronaren Herzkrankheit, und anderer makro- und mikroangiopathischen Gefäßerkrankungen. Unter Diagnose wird auch die  
55 Abschätzung des Risikos für die Entstehung dieser Krankheiten verstanden.

Vorteilhafte Ausgestaltungen der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Die besonderen Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens liegen in der einfachen und, falls gewünscht, quantifizierbaren Bestimmung von Triglyceriden in Proteinfractionen bei geringem apparativen Aufwand. Dies  
60 macht das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere für die Bestimmung der Triglyceride der LDL-Fraktion im Routinelabor hervorragend geeignet.

Triglyceride sind Ester des Dreifachalkohols Glycerin mit Fettsäuren. Die Menge an Triglyceriden wird über die Menge an verestertem Glycerin in den Triglyceriden bestimmt, wobei die Triglyceride in Assoziation mit den Proteinen elektrophoretisch in einer geeigneten Matrix aufgetrennt und dann enzymatisch gespalten werden.

65 Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist nicht nur die Bestimmung des Triglyceridgehalts in der LDL-Fraktion möglich, sondern es ermöglicht auch ohne zusätzlichen Aufwand die Bestimmung des Triglyceridgehalts in anderen Proteinfractionen, z. B. der VLDL-Fraktion und der HDL-Fraktion. Von großem Vorteil ist auch, daß freies, d. h. nicht proteingebundenes, Triglycerid bzw. Glycerin im Gegensatz zu den anderen proteinassoziierten

Triglyceriden durch die Elektrophorese nicht mit den Proteinfractionen wandert und deshalb nicht mit der Triglyceridbestimmung der Proteinfractionen interferiert. Aus diesem Grund ist es auch möglich, zusätzlich die Konzentration an freiem, unverestertem Glycerin bzw. freiem Triglycerid zu bestimmen.

Zur enzymatischen Spaltung der Triglyceride sind entsprechende Esterasen geeignet, z. B. das Enzym Lipase (Triacylglycerol-Acylhydrolase, EC 3.1.1.3). Im Hinblick darauf, daß in den Lipoproteinfractionen neben Triglyceriden auch noch andere Fettsubstanzen vorliegen, insbesondere Cholesterinester, kann man einen besonderen Effekt dadurch bewirken, daß zur Spaltung der Triglyceride Cholesterin-Esterase (EC 3.1.1.13) eingesetzt wird. Dies führt dazu, daß Triglyceride und Cholesterinester gleichzeitig gespalten werden. Im Ergebnis werden die Lipoproteinmoleküle wirksam denaturiert, und der Zugang des Enzyms zu dem Triglyceridsubstrat sowie der Zugang der Bestimmungsreagenzien im nachfolgenden Glycerin-Bestimmungsschritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird erleichtert.

Desweiteren bietet der Einsatz von Cholesterinesterase den Vorteil, daß infolge der gleichzeitigen Spaltung von Cholesterinester und Triglyceriden beide Stoffe in den jeweiligen Proteinfractionen bestimmt werden können. Zur Bestimmung des Cholesterins in Proteinfractionen kann z. B. das in der DE-A-36 40 349 beschriebene Verfahren angewandt werden. Die gleichzeitige oder unmittelbar nacheinander ausgeführte Bestimmung von sowohl Triglyceriden als auch Cholesterin aus einer Probe erhöht die Aussagekraft zur Diagnostik von Gefäßkrankungen, insbesondere der koronaren Herzkrankheit, sowie ihrer Risikoabschätzung.

Das durch die enzymatische Spaltung entstandene Glycerin kann bestimmt werden, indem die Trennungsmatrix, beispielsweise eine Gelmatrix, in einer Enzymlösung inkubiert wird, die als Enzyme Glycero-Kinase und Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase umfaßt, wodurch ein reduzierter Akzeptor von Reduktions-/Oxidationsäquivalenten entsteht, welcher durch eine Nachweisreaktion bestimmt wird. Die verwendete Enzymlösung enthält ferner die geeigneten Substrate und Cofaktoren. So wird das Glycerin mit einem Donor energiereicher Phosphatgruppen, wie z. B. Adenosintriphosphat (ATP) und dem Enzym Glycero-Kinase (EC 2.7.1.30) in Glycerol-3-Phosphat überführt, und das Glycerol-3-Phosphat wird mit dem Akzeptor von Reduktions-/Oxidationsäquivalenten, z. B. Nikotin-Adenin-Dinucleotid (NAD), und dem Enzym Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase (EC 1.1.1.8) in Dihydroxyacetonphosphat überführt, wobei der reduzierte Akzeptor von Reduktions-/Oxidationsäquivalenten (beim Beispiel von NAD ist dies NADH) entsteht, welcher durch geeignete, an sich bekannte Nachweisreaktionen bestimmt werden kann.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfaßt die Enzymlösung, mit der die Matrix inkubiert wird, zusätzlich die Enzyme Triosephosphat-Isomerase und Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, wodurch zusätzlich ein reduzierter Akzeptor von Reduktions-/Oxidationsäquivalenten gebildet wird, welcher durch die Nachweisreaktion bestimmt wird. Das heißt, es wird zusätzlich zu den oben erwähnten Schritten das sich bildende Dihydroxyaceton-Phosphat mit dem Enzym Triosephosphat-Isomerase (EC 5.3.1.1) in Glyceraldehyd-3-Phosphat überführt, und das Glyceraldehyd-3-Phosphat wird mit dem Akzeptor von Reduktions-/Oxidationsäquivalenten (z. B. NAD) und dem Enzym Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.12) in Glycerat-3-Phosphat überführt, wobei ein weiterer reduzierter Akzeptor von Reduktions-/Oxidationsäquivalenten (in diesem Beispiel NADH) entsteht, welcher wiederum durch die oben genannte, geeignete Nachweisreaktion bestimmt wird. Auf diese Weise werden aus einem Molekül Triglycerid bzw. Glycerin zwei Moleküle des reduzierten Akzeptors von Reduktions-/Oxidationsäquivalenten (z. B. NADH) gebildet. Somit vermag diese Maßnahme prinzipiell die Sensitivität des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Bestimmung von Triglyceriden in Proteinfractionen zu verdoppeln.

Die oben beschriebenen Schritte bzw. Reaktionen des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgen an bzw. in der Matrix, die zur elektrophoretischen Trennung der Proteinfractionen dient, wobei die enzymatische Spaltung der Triglyceride und die Bestimmung des dabei entstehenden Glycerins vorzugsweise gleichzeitig ablaufen.

Als Matrix-Grundmaterial kommt in erster Linie ein Gel in Frage, wobei ein Agarosegel oder ein vernetztes Polyacrylamidgel besonders geeignet ist. Vorzugsweise wird ein Agarosegel mit einer Agarosekonzentration von 0,5—2,0 Gew.-%, insbesondere 1,0 bis 1,5 Gew.-%, verwendet, weil es eine gute Auftrennung der Lipoproteinfractionen ermöglicht. Zusatz von Albumin in das Gel wirkt zusätzlich vorteilhaft für das Auftrennungsvermögen. Auch kombinierte Gele aus Polyacrylamid und Agarose sind für dieses Verfahren geeignet.

Die Nachweisreaktion zur Bestimmung der gebildeten reduzierten Akzeptoren von Reduktions-/Oxidationsäquivalenten wie NADH, die Rückschluß auf die Gegenwart des freigesetzten Glycerins und damit auf die ursprünglichen Triglyceride in der jeweiligen Proteinfraction zuläßt, erfolgt vorzugsweise densitometrisch. Durch diese Maßnahme kann der Triglyceridgehalt in den einzelnen, durch Elektrophorese aufgetrennten Proteinfractionen leicht quantifiziert werden.

Besonders gut eignet sich die densitometrische Nachweisbestimmung, bei der der reduzierte Akzeptor von Reduktions-/Oxidationsäquivalenten mit einem Farbindikator bestimmt wird, indem mit einem Elektronenkoppler ein Farbstoff reduziert wird, wobei der Farbstoff präzipitiert und dadurch densitometrisch bestimmt werden kann. Das heißt, die Reduktionsäquivalente des reduzierten Akzeptors von Reduktions-/Oxidationsäquivalenten (wie z. B. NADH) werden durch einen entsprechenden Elektronenkoppler auf einen geeigneten Farbstoff übertragen, der in der reduzierten Form wasserunlöslich ist und dadurch im oder auf dem Gel präzipitiert. Als Elektronenkoppler eignet sich beispielsweise das Enzym Diaphorase (EC 1.8.1.4); ein anderes Beispiel für einen zu verwendenden Elektronenkoppler ist Phenazinmethosulfat (PMS). Geeignete Farbstoffe, die durch die obige Reduktion präzipitieren und in dem Gel densitometrisch quantifizierbar sind, sind beispielsweise die Tetrazoliumsalze. Diese gehen durch die Reduktion in die entsprechenden Formazane über, die wasserunlöslich sind und demnach in oder auf dem Gel präzipitieren. Beispiele von solchen Tetrazoliumsalzen zur Formazanbildung sind Tetrazolium-Blau, Nitroblau-Tetrazolium (NBT), Tetrazolium-Violett, Tetrazolium-Purpur, 2-(p-Jodphenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid (INT) etc. Die densitometrische Bestimmung erfolgt dann am geeignetsten am Absorptionsmaximum der gebildeten Farbstoffe, beispielsweise im Fall von NBT oder INT bei

einer Wellenlänge von 570 nm.

Als ein besonders geeignetes Mittel zur Durchführung des Verfahrens zur Bestimmung von Triglyceriden in Proteinfractionen wird gemäß einem weiteren Gegenstand der vorliegenden Erfindung eine Enzymlösung zur Verfügung gestellt, die die zur Durchführung der Umsetzungen erforderlichen Enzyme und ggf. weitere für die Umsetzungen geeignete Bestandteile, wie Substrate und Cofaktoren, umfaßt. Somit umfaßt die Enzymlösung mindestens die Enzyme einer geeigneten Esterase, z. B. Cholesterinesterase, Glycerokinase und Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, sowie ggf. zusätzlich die Enzyme Triosephosphat-Isomerase, Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und einen Elektronenkoppler.

Die enzymatische Spaltung der Triglyceride und die Bestimmung des entstandenen Glycerins gemäß der vorliegenden Erfindung erfolgt in dieser bevorzugten Ausführungsform auf einfache Weise dadurch, daß die Trennmatrix, welche die elektrophoretisch aufgetrennten Proteinfractionen enthält, mit der genannten Enzymlösung inkubiert wird. Geeigneterweise erfolgt diese Inkubation der Matrix (z. B. eines Gels) in einer Lösung, welche neben den genannten Enzymen ein auf einen pH-Bereich von etwa 7,5 bis 9 einstellendes Puffersystem, wie Glycylglycin-Puffer oder Tris-Puffer, Adenosintriphosphat (ATP) als Donor energiereicher Phosphatgruppen, Nikotin-Adenin-Dinucleotid (NAD) als Akzeptor von Reduktions-/Oxidationsäquivalenten, einen Calciumionen-Chelator wie EDTA, ein Magnesiumsalz wie  $MgCl_2$ , wobei die Chelatierung von  $Ca^{2+}$ -Ionen sowie die Bereitstellung von  $Mg^{2+}$ -Ionen einer wirksamen Phosphorylierung dienen, sowie ggf. den Farbindikator enthält.

Eine geeignete Zusammensetzung der Enzymlösung, die zur Inkubation der Trennmatrix dient, enthält die folgenden Bestandteile mit den angegebenen Konzentrationen: 0,5–60 kU/l Cholesterin-Esterase, 0,5–50 kU/l Glycerokinase, 1–500 kU/l Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, 10–3000 kU/l Triose-Phosphat-Isomerase, 1–250 kU/l Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 0,5–50 kU/l Diaphorase, 50 mM–1 M Glycylglycin, 0,5 mM–50 mM ATP, 0,5 mM–50 mM NAD, 0,1 mM–5 mM EDTA, 2 mM–100 mM  $MgCl_2$  und 0,5 mM–20 mM NBT.

Desweiteren können in der Enzymlösung bzw. Inkubationslösung zusätzliche Additive enthalten sein, z. B. Enzym-Stabilisatoren, Enzym-Aktivatoren, wie Gallensäuren (Cholate) und Detergenzien (z. B. Genapol) zur Aktivierung der Cholesterin-Esterase, Konservierungsmittel usw.

Die Inkubation des Gels zur enzymatischen Spaltung der Triglyceride und der Bestimmung des Glycerins erfolgt hinsichtlich der Dauer der Inkubation und der Temperatur der Inkubationslösung unter den Bedingungen, die geeignet sind, eine zur densitometrischen Bestimmung ausreichenden Menge an präzipitierendem Farbstoff hervorzurufen. Geeignet sind Inkubationszeiten von mindestens 10 Min., vorzugsweise 25 bis 35 Min. und insbesondere 30 Min. Die Inkubationstemperatur liegt geeigneterweise in einem Bereich von 20°C bis 40°C, vorzugsweise in einem Bereich von 25 bis 35°C und insbesondere bei etwa 30°C.

Vorstehend wurde eine bevorzugte Ausführungsform beschrieben, bei der die Bestimmung des nach der enzymatischen Spaltung der Glyceride entstandenen Glycerins erfolgt, indem durch enzymatische Umsetzungen ein reduzierter Akzeptor von Reduktions-/Oxidationsäquivalenten gebildet wird. Einsetzbar sind jedoch auch Systeme, in denen oxidierte Akzeptoren von Reduktions-/Oxidationsäquivalenten gebildet werden, wobei dann ein entsprechend anderer Farbstoff eingesetzt wird, der dann durch Oxidation präzipitiert und in der Matrix (z. B. dem Gel) densitometrisch quantifizierbar ist.

Alternativ kann die Bestimmung im zuvor beschriebenen System, bei dem ein reduzierter Akzeptor von Reduktions-/Oxidationsäquivalenten bestimmt wird, z. B. luminometrisch dadurch erfolgen, daß Flavinmononukleotid (FMN) mit Flavinmononukleotid-Reduktase (EC 1.6.8.1) reduziert wird und das reduzierte Flavinmononukleotid ( $FMNH_2$ ) luminometrisch bestimmt wird, indem es zusammen mit geeigneten Cosubstraten wie einem Alkanal (z. B. Tetradekanal) in Gegenwart von Sauerstoff durch das Enzym Luciferase umgesetzt wird, wobei Licht ausgesandt wird. Die in dieser Ausführungsform eingesetzte luminometrische Bestimmung kann z. B. dadurch erfolgen, daß die erforderlichen Reaktionen in der Trennungsmatrix ablaufen und gleichzeitig ein lichtempfindlicher Film unter Abschirmung äußerer Lichteinstrahlung auf die Matrix gelegt wird, so daß die bei der Luciferase-Reaktion erzeugte Lichtstrahlung an den entsprechenden Stellen in der Matrix eine Schwärzung im Film verursacht werden.

Als weitere Alternative zu den obigen Ausführungsformen, bei denen die Umsetzungen zur enzymatischen Spaltung der Triglyceride und zur Bestimmung des entstehenden Glycerins in der Trennmatrix erfolgen, können die Triglycerid-assoziierten Proteinfractionen nach der elektrophoretischen Auftrennung auch durch geeignete Mittel, z. B. elektrophoretisch oder durch sogenanntes "Blotten", auf ein proteinbindendes Schichtmaterial, beispielsweise Nitrocellulosepapier, übertragen werden, wonach die Umsetzungen zur enzymatischen Spaltung der Triglyceride und zur Bestimmung des dadurch entstandenen Glycerins wie oben beschrieben angeschlossen werden können.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung von Triglyceriden in Proteinfractionen bzw. die Enzymlösung zur Durchführung des Verfahrens eignet sich besonders gut zur In-Vitro-Diagnose, der Prognose und Risikoabschätzung von Gefäßerkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit. Dabei kann angenommen werden, daß insbesondere die kleinen, triglyceridreichen LDL mit der koronaren Herzkrankheit und anderen Gefäßerkrankheiten assoziiert sind.

Die vorliegende Erfindung wird nachstehend durch die folgenden Beispiele unter Bezugnahme auf die beigefügten Figuren näher erläutert, wobei

Fig. 1 die Umsetzungen in einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zeigt,

Fig. 2 die graphische Dosis-Signal-Darstellung zeigt, die durch graphische Auftragung der im erfindungsgemäßen Verfahren nach der bevorzugten Ausführungsform eingesetzten Proteinkonzentrationen gegen das Ausmaß der Farbindikation (angefärbte Gelfläche) erhalten wurde, und

Fig. 3A eine fotografische Darstellung eines Gels nach Bestimmung der proteinassoziierten Triglyceride

nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zusammen mit einer Cholesterin-Bestimmung und Fig. 3B die entsprechende densitometrische Verteilung zeigt.

## Beispiele 1 und 2

Serumlipoproteine unterschiedlicher Mengen wurden wie folgt einer Agarosegelelektrophorese unterworfen. Die Proteinproben wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und anschließend bei 400 V und 20°C einer Elektrophorese unterworfen.

Anschließend wurde die Triglyceridbestimmung auf 2 Arten durchgeführt.

Im Beispiel 1 wurden alle in Fig. 1 durch die Schritte (a) bis (f) dargestellten Reaktionen durchgeführt. Die Enzymabkürzungen in Fig. 1 sind: CE = Cholesterin-Esterase, GK = Glycerokinase, GDH = Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, TIM = Triosephosphat-Isomerase, GADPH = Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, und DP = Diaphorase; P bedeutet Phosphat, NBT bedeutet Nitroblau-Tetrazolium.

Im Anschluß daran wurde das Agarosegel mit den Proteinfractionen in einer Enzymsubstratlösung, deren Zusammensetzung im folgenden aufgelistet ist, inkubiert, um die in Fig. 1 dargestellten Reaktionen ablaufen zu lassen. Die Enzymsubstratlösung wurde kurz zuvor auf Inkubationstemperatur gebracht, und das Gel wurde für 30 Min. bei 30°C inkubiert.

Zusammensetzung der Enzymsubstratlösung:

Glycylglycin	0,2 M	20
ATP	5 mM	
NAD <sup>+</sup>	5 mM	
EDTA	0,5 mM	
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	25
4-NBT	3 mM	
Cholesterin-Esterase (EC 3.1.1.13)	6 kU/l	
Glycerokinase (EC 2.7.1.30)	4,8 kU/l	
Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.8)	48 kU/l	
Triosephosphat-Isomerase (EC 5.3.1.1)	300 kU/l	30
Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	24 kU/l	
Diaphorase (EC 1.8.1.4)	4,8 kU/l	

Die oben genannte Formulierung wurde erhalten, indem zunächst folgende Mengen an Stammlösungen, die im einzelnen noch beschrieben werden, zusammengegeben wurden, um die Substrat/Farbstoff-Lösung herzustellen:

Reaktionspuffer	1,2 ml	
ATP	250 µl	40
NAD <sup>+</sup>	250 µl	
EDTA	75 µl	
MgCl <sub>2</sub>	30 µl	
4-NBT	45 µl	45

Daneben wurden folgende Enzyme separat vorpipettiert, bis kurz vor der Anwendung auf Eis belassen und dann mit dem oben aufgeführten Puffer/Substrat/Farbstoff-Gemisch zusammengegeben:

Cholesterin-Esterase	75 µl	50
Glycerokinase	30 µl	
Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase	75 µl	
Triosephosphat-Isomerase	75 µl	
Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	75 µl	55
Diaphorase	65 µl	

Die einzelnen Stammlösungen setzen sich wie folgt zusammen:

Reaktionspuffer: Es werden 6,6 g Glycylglycin in 250 ml aqua bidest gelöst und auf pH 8,5 eingestellt (Glycylglycin-Puffer 0,2 M). 81 mg MgCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O, 86 mg Na-Cholat und 0,5 ml Genapol® werden mit Glycylglycin-Puffer auf 100 ml aufgefüllt.

ATP: 60,5 mg Adenosin-5'-Triphosphat-Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub> × 3H<sub>2</sub>O werden in 2 ml Reaktionspuffer gelöst (Stammlösung 50 mM).

NAD: 27 mg β-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid werden in 1 ml Reaktionspuffer gelöst (Stammlösung 40 mM).

EDTA: 724 mg EDTA-Na<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O werden in 10 ml Reaktionspuffer gelöst (Stammlösung 20 mM).

MgCl<sub>2</sub>: 2,03 MgCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O g werden in 10 ml Reaktionspuffer gelöst (Stammlösung 1 M).

4-Nitroblautetrazolium (4-NBT): 50 mg 4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid werden in 250 µl 70% Dimethylformamid gelöst (Stammlösung 20% (w/v)).

Enzyme: 100 U lyophilisierte Cholesterin-Esterase werden in 500 µl Reaktionspuffer gelöst. 200 U lyophilisierte Diaphorase werden in 500 µl Reaktionspuffer gelöst. Alle anderen Enzyme kommen mit folgender Enzymaktivität zur Anwendung: Glycerokinase 425 kU/l, Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase 1700 kU/l, Triosephosphat-Isomerase 10 000 kU/l und Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase 800 kU/l.

Nachdem das Agarosegel in einer Enzymsubstratlösung der oben genannten Zusammensetzung inkubiert wurde, wurde die Inkubationslösung durch Waschungen entfernt und die angefärbten Banden mittels 10% (v/v) Essigsäure für 30 Min. fixiert. Die Gele wurden dann in destilliertes Wasser für weitere 30 Min. eingetaucht und getrocknet. Schließlich wurden die rot/violett eingefärbten mit Licht einer Wellenlänge von 570 nm densitometrisch ausgewertet. Nach der Fixierung und der Trocknung konnte das Gel jedoch auch für Monate gelagert werden, ohne daß der Informationsgehalt verloren ging. Das heißt, die Farbindikation ist stabil. Somit konnte die densitometrische Informationsauswertung falls gewünscht auch zu irgendeinem späteren Zeitpunkt erfolgen.

Im Beispiel 2 wurden nur die in Fig. 1 dargestellten Schritte (a) bis (c) und (f) ausgeführt, daß heißt unter Weglassen der Schritte (d) und (e). Hierzu wurden die eingesetzten Mengen der Enzyme Triosephosphat-Isomerase und Glyceraldehyd-Dehydrogenase ersetzt durch entsprechende Volumenmengen Reaktionspuffer. Ansonsten wurde jedoch wie in Beispiel 1 verfahren.

Die Resultate der gemäß den Beispielen 1 und 2 angewandten Bestimmungsmethoden sind in Fig. 2 dargestellt. Aus der Abszisse sind die Mengen der in beiden Beispielen entsprechend eingesetzten Serumlipoproteine ersichtlich, aus der Ordinate das Maß der Anfärbung durch Bestimmung der angefärbten Fläche (willkürlicher Maßstab).

Wie der Fig. 2 zu entnehmen ist, weist die Bestimmungsmethode, die in Gegenwart der Enzyme Triosephosphat-Dehydrogenase und Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase ausgeführt wird, also alle Schritte (a) bis (f) umfaßt, gegenüber derjenigen, die ohne die genannten Enzyme ausgeführt wird und somit lediglich die Schritte (a) bis (c) und (f) einschließt, eine nahezu zweifach höhere Sensitivität auf.

Desweiteren wurde in den Beispielen 1 und 2 ein weiter, linearer analytischer Bereich beobachtet, d. h. die graphische Beziehung zwischen der eingesetzten, triglyceridhaltigen Proteinkonzentrationen und den sich daraus ergebenden Signalwerten (die Farbindikation) war in einem weiten Konzentrationsbereich der Proteine linear. Somit eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren hervorragend für quantitative Bestimmungen der proteinassoziierten Triglyceride.

#### Beispiel 3

Jeweils 1 µl Verschiedener Blutserumproben wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und anschließend bei 400 V und 20°C einer Elektrophorese unterworfen. Dadurch wurden die einzelnen, im Blutserum enthaltenen Proteine in Proteinfractionen aufgetrennt.

Anschließend wurde eine enzymatische Spaltung der Trilyzeride sowie eine enzymatische Bestimmung des dabei entstandenen Glycerins wie in Beispiel 1 durchgeführt. Parallel hierzu wurde der Cholesteringehalt in den jeweiligen Proben gemäß der DE-A-36 40 349 durchgeführt.

Fig. 3A zeigt die gemäß der Erfindung angefärbten Triglyceridassoziierten Proteinfractionen der Blutserumproben im Gel (s. die mit TG (Triglycerid) bezeichneten Gelbahnen). Daneben sind die Cholesterin-Bestimmungen (s. die mit CH (Cholesterin) bezeichneten Bahnen) zu sehen. Fig. 3B zeigt die mit einem Densitometer aufgezeichneten, entsprechenden densitometrischen Verteilungen der unterschiedlichen Proben.

Es wurden 3 Lipoprotein-Fractionen sichtbar, nämlich die LDL/TG-Fraktion, die VLDL/TG-Fraktion und die HDL/TG-Fraktion. Desweiteren ist als vierte Bande freies Glycerin zu erkennen. Über die densitometrische Bestimmung läßt sich die prozentuale Verteilung der Triglyceride in den Lipoprotein-Fractionen ermitteln (s. rechte Spalte in Fig. 3B).

Für eine absolute Bestimmung des Triglyceridgehalts in den einzelnen Proteinfractionen im Blutserum werden die relativen Anteile der Fractionen mit dem Gesamttriglyceridgehalt im Blutserum multipliziert, wobei der Gesamttriglyceridgehalt im Blutserum durch bekannte, herkömmliche Verfahren bestimmt werden kann.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von Triglyceriden in Proteinfractionen, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
  - a) elektrophoretische Auftrennung der Proteinfractionen in einer geeigneten Matrix,
  - b) enzymatische Spaltung der Triglyceride und
  - c) Bestimmung des durch Schritt b) entstandenen Glycerins.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Triglyceride mit Cholesterin-Esterase gespalten werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das entstandene Glycerin bestimmt wird, indem das Gel in einer Enzymlösung inkubiert wird, die als Enzyme Glycero-Kinase und Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase umfaßt, wodurch ein reduzierter Akzeptor von Reduktions-/Oxidationsäquivalenten gebildet wird, welcher durch eine Nachweisreaktion bestimmt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzymlösung zusätzlich die Enzyme Triosephosphat-Isomerase und Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase umfaßt, wodurch zusätzlich ein reduzierter Akzeptor von Reduktions-/Oxidationsäquivalenten gebildet wird, welcher durch die Nachweis-



reaktion bestimmt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß der reduzierte Akzeptor von Reduktions-/Oxidationsäquivalenten mit einem Farbindikator bestimmt wird, indem mit einem Elektronenkoppler ein Farbstoff reduziert wird, der präzipitiert und densitometrisch bestimmt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Elektronenkoppler Diaphorase verwendet wird.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß ein Tetrazoliumsalz reduziert wird, wobei ein Formazan-Farbstoff präzipitiert und bei der Wellenlänge des Farbstoff-Absorptionsmaximums densitometrisch bestimmt wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die enzymatische Spaltung der Triglyceride und die Bestimmung des Glycerols durch Inkubation des Gels in einer Lösung erfolgt, welche neben den genannten Enzymen ein auf einen pH-Bereich von 5,7 bis 9 einstellendes Puffersystem, Adenosintriphosphat als Donor energiereicher Phosphatgruppen, Nicotin-Adenin-Dinukletid als Akzeptor von Reduktions-/Oxidationsäquivalenten, einen Ca-Ionen-Chelator und ein Magnesiumsalz und ggf. den Farbindikator enthält.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Inkubationslösung die folgenden Bestandteile enthält:

50 mM bis 1 M Glycylglycin, 0,5 mM bis 50 mM Adenosintriphosphat, 0,5 mM bis 50 mM Nucleotin-Adenin-Dinucleotid, 0,1 mM bis 5 mM EDTA, 2 mM bis 100 mM  $MgCl_2$ , 0,5 mM bis 20 mM 4-Nitroblau-Tetrazolium, 0,5 bis 60 kU/l Cholesterin-Esterase, 0,5 bis 50 kU/l Glycerokinase, 1 bis 500 kU/l Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, 10 bis 3000 kU/l Triosephosphat-Isomerase, 1 bis 250 kU/l Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und 0,5 bis 50 kU/l Diaphorase.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die enzymatische Spaltung der Triglyceride und die Bestimmung des Glycerols durch Behandlung der Matrix in einer Inkubationszeit von mindestens 10 Min. einer Inkubationstemperatur von 20°C bis 40°C erfolgt.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß alle Schritte in der Matrix erfolgen, wobei der Schritt der enzymatischen Spaltung und der Bestimmungsschritt gleichzeitig durchgeführt werden.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Matrix ein Gel verwendet wird.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß ein Agarosegel, ein Polyacrylamidgel oder ein kombiniertes Agarose-Polyacrylamid-Gel verwendet wird.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich Cholesterin in den Proteinfractionen bestimmt wird.

15. Enzymlösung zur Durchführung des Verfahrens nach irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, umfassend die Enzyme Esterase, Glycerokinase und Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase.

16. Enzymlösung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich die Enzyme Triosephosphat-Isomerase, Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und einen Elektronenkoppler umfaßt.

17. Enzymlösung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß sie neben den genannten Enzymen ein auf einen pH-Bereich von 5,7 bis 9 einstellendes Puffersystem, Adenosintriphosphat als Donor energiereicher Phosphatgruppen, Nicotin-Adenin-Dinukletid als Akzeptor von Reduktions-/Oxidationsäquivalenten, einen Ca-Ionen-Chelator, ein Magnesiumsalz und einen Farbindikator enthält.

18. Enzymlösung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß sie die folgenden Bestandteile enthält: 50 mM bis 1 M Glycylglycin, 0,5 mM bis 50 mM Adenosintriphosphat, 0,5 mM bis 50 mM Nucleotin-Adenin-Dinucleotid, 0,1 mM bis 5 mM EDTA, 2 mM bis 100 mM  $MgCl_2$ , 0,5 mM bis 20 mM 4-Nitroblau-Tetrazolium, 0,5 bis 60 kU/l Cholesterin-Esterase, 0,5 bis 50 kU/l Glycerokinase, 1 bis 500 kU/l Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, 10 bis 3000 kU/l Triosephosphat-Isomerase, 1 bis 250 kU/l Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und 0,5 bis 50 kU/l Diaphorase.

19. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur In-Vitro-Diagnose von Gefäßkrankungen.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

## F I G . 1

- (a) Triglyceride + 3 H<sub>2</sub>O  $\xrightleftharpoons{CE}$  Glycerin + 3 freie Fettsäuren
- (b) Glycerin + ATP  $\xrightleftharpoons{GK}$  Glycerin-3-P + ADP
- (c) Glycerin -3-P + NAD<sup>+</sup>  $\xrightleftharpoons{GDH}$  Dihydroxyaceton -P + NADH + H<sup>+</sup>
- (d) Dihydroxyaceton -P  $\xrightleftharpoons{TIM}$  Glyceraldehyd -3-P
- (e) Glyceraldehyd -3-P + H<sub>2</sub>O + NAD<sup>+</sup>  $\xrightleftharpoons{GAPDH}$  Glycerat -3-P + NADH + H<sup>+</sup>
- (f) 2 (NADH + H<sup>+</sup> + 4-NBT)  $\xrightarrow{DP}$  NAD<sup>+</sup> + Formazan )

FIG. 2

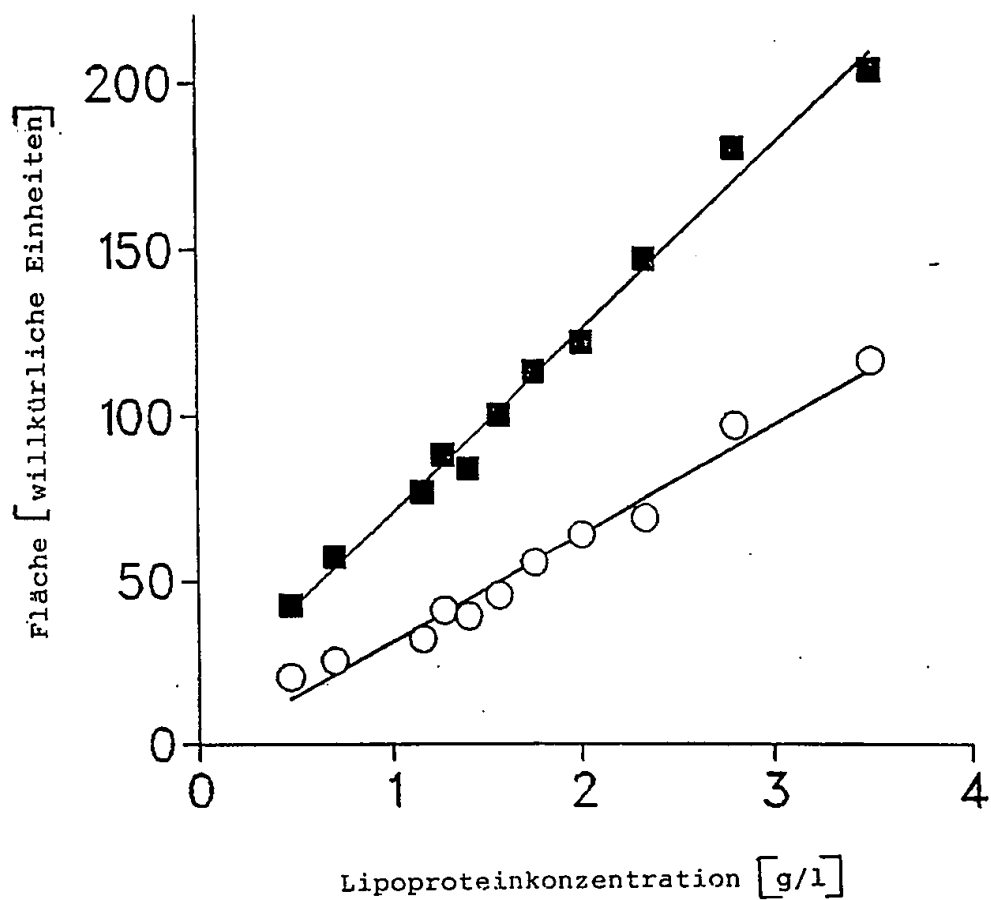


FIG. 3 A

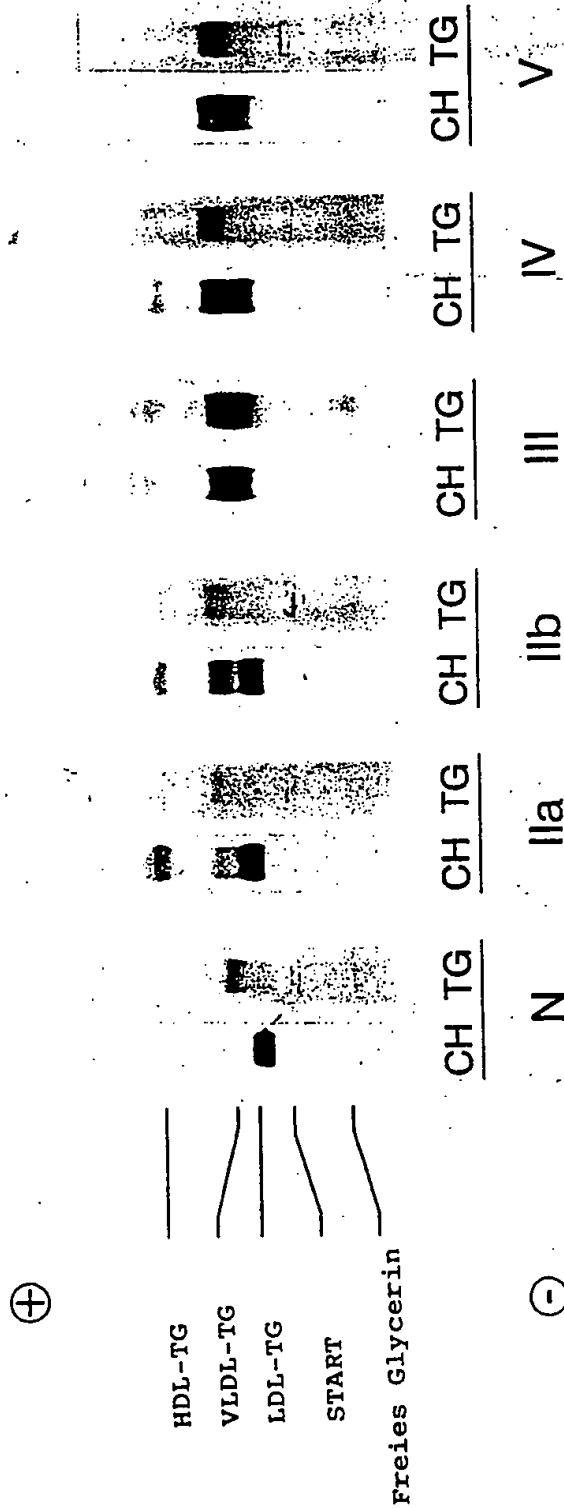
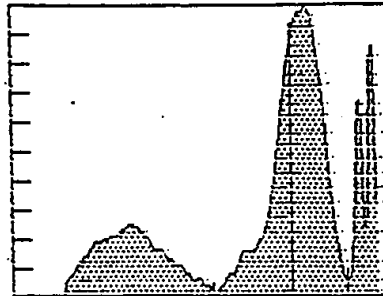
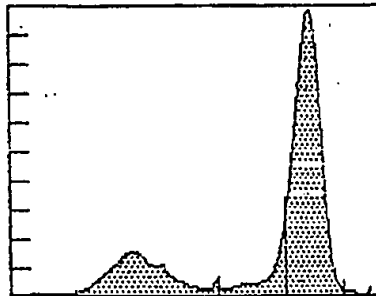


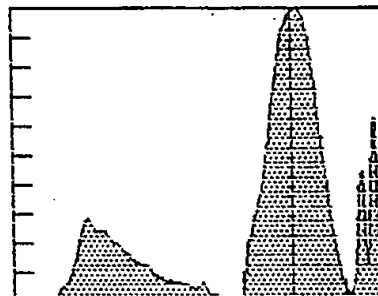
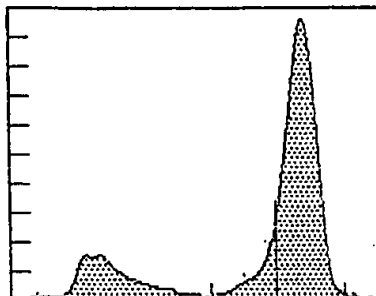
FIG. 3 B

Cholesterin

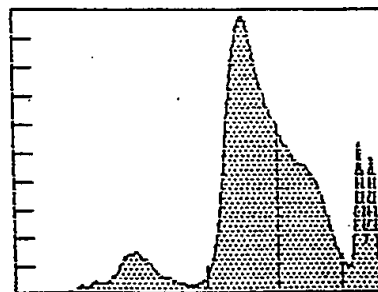
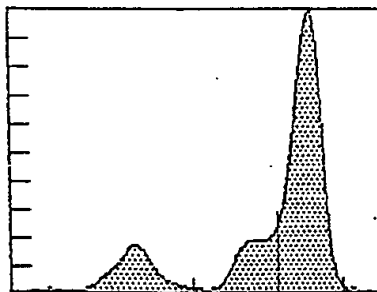
Triglyceride



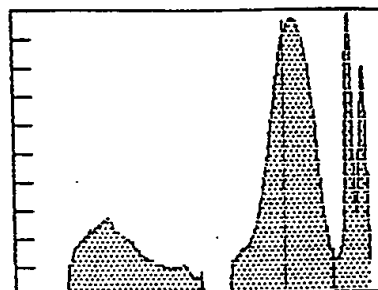
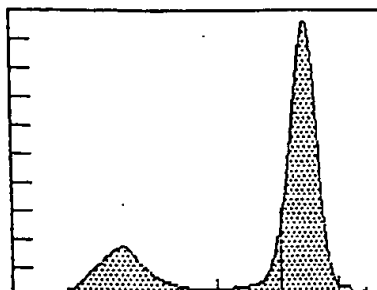
Fraktion	%
HDL	28,0
VLDL	28,0
LDL	43,9



HDL	24,9
VLDL	37,4
LDL	37,6



Fraktion	%
HDL	10,6
VLDL	59,6
LDL	29,9



HDL	28,4
VLDL	30,0
LDL	41,6

↑  
HDL

↑  
VLDL

↑  
LDL

↑  
START